

PCT

世界知的所有権機関  
国・際・事 務 局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12Q 1/60, 1/44, 1/26, 1/32</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO95/24502</b> <b>(43) 国際公開日</b> 1995年9月14日(14.09.95)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP95/00378 <b>(22) 国際出願日</b> 1995年3月8日(08.03.95) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平6/37328 1994年3月8日(08.03.94) JP 特願平6/217224 1994年9月12日(12.09.94) JP 特願平6/296137 1994年11月30日(30.11.94) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 協和メデックス株式会社(KYOWA MEDEX CO., LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区入船二丁目1番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者：および</b> <b>(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)</b> 宮内一人(MIYAUCHI, Kazuhito)(JP/JP) 〒419-01 静岡県田方郡函南町仁田816-4 Shizuoka, (JP) 三池 彰(MIIKE, Akira)(JP/JP) 〒411 静岡県駿東郡長泉町中土狩28-8 Shizuoka, (JP) 首藤栄子(SHUTOH, Eiko)(JP/JP) 〒870 大分県大分市花園17組-3 Ohita, (JP)		杉内博幸(SUGIUCHI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒862 熊本県熊本市長嶺町1675-31 Kumamoto, (JP) 入江徹美(IRIE, Tetsumi)(JP/JP) 〒862 熊本県熊本市健軍町2484-17 Kumamoto, (JP) 上釜兼人(UKAMA, Kaneto)(JP/JP) 〒862 熊本県熊本市長嶺町1716-80 Kumamoto, (JP) 大澤 進(OHSAWA, Susumu)(JP/JP) 〒284 千葉県四街道市みそら4-17-9 Chiba, (JP) <b>(81) 指定国</b> AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title : METHOD OF DETERMINING CHOLESTEROL IN HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法  <b>(57) Abstract</b>  A method of determining cholesterol in high-density lipoprotein (HDL) by treating a HDL-containing specimen with a cholesterol ester hydrolase and a cholesterol oxidase or a cholesterol dehydrogenase in the presence of a reagent capable of aggregating lipoproteins other than HDL, and determining the formed hydrogen peroxide or reduced coenzyme.		

(57) 要約

HDL 以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDL を含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とする HDL 中のコレステロールの定量法に関する。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TD	チャド
CC	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KE	ケニア	NE	ネジール	UG	ウガンダ
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド		
		LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

技 術 分 野

本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロール（以下、HDLコレステロールという）の定量法に関する。

背 景 技 術

HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のHDLコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってHDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法（SRID法）、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアポ蛋白を認識しており、正確にはリポ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リポ蛋白（LDL）、超低密度リポ蛋白（VLDL）およびカイロミクロン（CM）の表面に存在するアポ蛋白Bにポリエチレングリコール、ヘパリン、リントングステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと2価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のHDLコレステロールを定量する（臨床検査法提要、第29版、金井泉著、金原出版、471頁、1983年）。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている

自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したHDL画分を定量ピペットではかり取る場合などに人為的誤差も生じ易い。以上のように、HDLコレステロール測定の煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にHDLを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、HDLコレステロールを特異的に定量できない。特開昭63-126498には、コール酸類を添加してその特異性を高めることが記載されているが、この方法では、HDLのみならずLDL、VLDLなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくいことにより、特異性が必ずしも充分でない。

#### 発明の開示

本発明者らは、HDL以外のリポ蛋白すなわちLDL、VLDLおよびCMを凝集させる試薬の存在下、コレステロール反応試薬を用いてコレステロール定量の酵素反応をさせることにより、特に生成した凝集物を分離することなくHDLを含有する試料中のHDLコレステロールを特異的に定量できることを見出し、本発明に至った。

本発明は、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロール加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法に関する。

本発明方法は、血液、尿などのHDLを含有する体液に適用できる。

次に、本発明の定量法の一例について説明する。

第一試薬として、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬を含む中性付近の緩衝液を調製する。また、第二試薬として、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ（またはコレステロールデヒドロゲナーゼ）、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬〔またはNAD(P)〕を含む緩衝液を調製する（トリンダー試薬は第一試薬中に入れてもよい）。体液検体を一定量第一試薬に添加し、例えば37℃で数分間加温してLDL、VLDLおよびCMを凝集させる。これに第二試薬を添加、攪拌して酵素反応させる際

、コレステロールオキシダーゼにより過酸化水素が発生する場合には4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬から過酸化水素とパーオキシダーゼによって生成する色素の極大波長における吸光度を測定し、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合にはNAD(P)Hの増加を300~500 nm、好ましくは330~400 nm、例えば340 nmでの吸光度で測定する(ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマザン色素の発色に導き、ホルマザン色素を比色定量することも可能である)。HDLコレステロール量は、別途一定量のコレステロールを含む標準液で同じ操作を行い、比較計算する。なお、第一試薬と第二試薬とを最初からまとめ、これに体液検体を添加して例えば37℃で数分間加温し、LDL、VLDLおよびCMを凝集させてさらに酵素反応させることもできる。

リポ蛋白を凝集させる試薬には凝集剤および2価の金属塩が含まれる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リントングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。

凝集剤としては、0.02~10 mMの分子量5000~20000のヘパリンまたはその塩、0.1~10 mMの分子量4000~8000のリントングステン酸またはその塩、0.01~5 mMの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~20 mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3~100 mMの分子量4000~25000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1~50 mMの分子量1000~3000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~50 mMの分

子量 400～3000 の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03～1 mM の分子量 14000～16000 のヘパリンまたはその塩、0.1～3 mM の分子量 5000～7000 のリントングステン酸またはその塩、0.01～5 mM の分子量 150000～250000 のデキストラン硫酸またはその塩、0.1～10 mM の分子量 1000～5000 のデキストラン硫酸またはその塩、1.0～50 mM の分子量 5000～22000 の PEG、0.1～10 mM の分子量 1000～2000 の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1～10 mM の分子量 400～2000 の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが用いられる。

2価の金属塩としては、0.1～50 mM のマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられ、好ましくは、0.1～50 mM のマグネシウム塩が用いられる。

トリンダー試薬としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン (EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-スルホプロピルアニリン、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸、フェノールなどがあげられる。

酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼなどのコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼなどのコレステロール酸化酵素、および微生物または動物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼなどのコレステロール脱水素酵素があげられる。これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

本発明の系は、通常のコレステロールを測定する系を含んでいるため、コレステロールオキシダーゼを活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもできる。界面活性剤としては、ノニオン系、アニオン系、カチオン系の界面活性剤が0～1%の範囲で使用され、コール酸類としては、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0～5%の範囲で使用され、塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0～100mMの範囲で使用される。

緩衝剤としては、5～500mMのトリス、グッドの緩衝剤などが好適に使用される。pHは5～9の範囲がよい。

以下に、本発明の実施例を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例 1

人血清中のHDLコレステロール濃度を、直接HDLコレステロールを測定する本法、リントングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法（以下、単に沈殿法ともいう）〔デタミナーHDL（協和メデックス社製）で沈殿〕（臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年）および特開昭63-126498に記載のコール酸を用いる方法（以下、A法という）を用いてそれぞれ測定

した。

### 本法の組成

第一試薬	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
	アジ化ナトリウム	0.1	mg/ml
第二試薬	トリス	20	mM (pH 7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	パーオキシダーゼ	30	U/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	U/ml
	コレステロールオキシダーゼ	1	U/ml

本法では、検体50  $\mu$ lを第一試薬2.25 mlに添加し、37℃で5分間インキュベーションし、この時点で一旦555 nmの吸光度を測定した(E1)。次いで、第二試薬を0.75 ml添加して攪拌し、5分後の同波長における吸光度を測定した(E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200 mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の値を比較することにより算出した。

沈殿法では、遠心分離後日立7250自動分析機を用いてデタミナーLTC (協和メデックス社製)で測定した。

結果を第1表に示す。

第 1 表

	本法	沈殿法	A法
人血清 1	2.8 mg/dl	2.4 mg/dl	5.8 mg/dl
人血清 2	3.9	3.8	7.9
人血清 3	5.7	5.6	8.2

本法は、現在HDLコレステロールの測定法として常用されているリントング



ステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法とよい相関を示した。

## 実施例 2

第一試薬に用いる凝集剤および2価の金属塩を下記に示すA～Iの組成に種々組み換える以外は実施例1の本法と同様の操作を行い、血清検体30検体を日立7250自動分析機(検体4 $\mu$ l、第一試薬300 $\mu$ l、第二試薬100 $\mu$ lの条件)でそれぞれ測定した。本法と沈殿法との相関を相関係数(R)でみた。

### 第一試薬の組成

A.	リタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
B.	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=4000)	7.5	mg/ml (1.9mM)
	硫酸Mg・7水和物	10	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
C.	ヘパリンナトリウム	10	mg/ml (0.7mM)
	塩化Ca・2水和物	10	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
D.	リタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=200000)	7.5	mg/ml (1.9mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
E.	リタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	ヘパリンナトリウム	7.5	mg/ml (0.5mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
F.	リタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	PEG6000	7.5	mg/ml (1.25mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	mg/ml

EMSE	0.3 mg/ml
G. PEG 6000	5 mg/ml (0.83 mM)
硫酸Mg・7水和物	5 mg/ml
EMSE	0.3 mg/ml
H. 硫酸化	
$\alpha$ -シクロデキストリン	1 mg/ml (0.8 mM)
塩化Mg・6水和物	5 mg/ml
N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)- m-トルイジン	0.6 mg/ml
I. 硫酸化	
マルトヘプタオース	2 mg/ml (0.6 mM)
塩化Mg・6水和物	5 mg/ml
N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン	0.7 mg/ml

結果を第2表に示す。

第 2 表

相関係数	
A.	R=0.902
B.	R=0.859
C.	R=0.889
D.	R=0.923
E.	R=0.910
F.	R=0.909
G.	R=0.835
H.	R=0.911
I.	R=0.877

## 実施例 3

第一試薬に添加される 2 価の金属塩として硫酸マグネシウム (Mg)、塩化カルシウム (Ca)、塩化マンガン (Mn) および塩化ニッケル (Ni) を用い、添加量をそれぞれ 30 mM として実施例 1 の本法と同様の操作を行い、血清検体 30 検体を日立 7250 自動分析機 (検体 4  $\mu$ l、第一試薬 300  $\mu$ l、第二試薬 100  $\mu$ l の条件) でそれぞれ測定した。本法と沈澱法との相関を相関係数 (R) でみた。

組成

第一試薬	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	2 価の金属塩	30	mM
	EMSE	0.3	mg/ml
	塩化ナトリウム	5	mg/ml
	アジ化ナトリウム	0.1	mg/ml
第二試薬	トリス	2.0	mM (pH 7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	mg/ml
	パーオキシダーゼ	30	U/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	U/ml
	コレステロールオキシダーゼ	1	U/ml

結果を第 3 表に示す。

第 3 表

2 価の金属塩	相関係数
硫酸 Mg	R = 0.914
塩化 Ca	R = 0.835
塩化 Mn	R = 0.816
塩化 Ni	R = 0.798

## 実施例 4

サンブライト 4001 (日本油脂) を用いて、ポリエチレングリコール (分子量 6000) で化学修飾したコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼをそれぞれ調製し、これらを用いて下記に示す組成で実施例 1 の本法と同様の操作を行い、人血清中の HDL コレステロール濃度を測定した。また、沈殿法を用いて人血清中の HDL コレステロール濃度を測定した。

組成

第一試薬	リタングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム (MW=4000)	7.5	mg/ml (1.9 mM)
	硫酸 Mg · 7 水和物	7.5	mg/ml
	EMSE	0.3	mg/ml
	塩化ナトリウム	5	mg/ml
	アジ化ナトリウム	0.1	mg/ml
	アスコルビン酸		
	オキシダーゼ	1	U/ml
第二試薬	トリス	20	mM (pH 7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	mg/ml
	パーオキシダーゼ	30	U/ml
	修飾コレステロール		
	エステラーゼ	1	U/ml
	修飾コレステロール		
	オキシダーゼ	1	U/ml

なお、化学修飾は、20 mM リン酸緩衝液 (pH 8) に酵素 (10 mg/ml) を溶解させて 5℃ に冷却後、これに 20 倍モルのサンブライト 4001 を添加して溶解させ、5℃ で 4 時間反応させて行った。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

結果を第 4 表に示す。

第 4 表

		本法	沈殿法
人血清	1	2.6 mg/dl	2.4 mg/dl
人血清	2	3.7	3.8
人血清	3	5.6	5.6

## 実施例 5

リタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg 沈殿法でHDLコレステロール濃度が3.8. 9 mg/dlと測定された検体50  $\mu$ lを下記に示す組成の試薬3 mlに添加し、20秒後に一旦555 nmの吸光度を測定した(E1)。

組成

試薬	ピペラジン-1, 4-ビス(2- エタンスルホンニックアシッド) [同仁化学研究所(株)]
	3 mg/ml (9.9 mM) (pH 7)
EMSE	0.3 mg/ml
デキストラン硫酸	
ナトリウム	0.7 mg/ml (1.4 $\mu$ M)
硫酸Mg・7水和物	7 mg/ml
4-アミノアンチピリン	0.5 mg/ml
パーオキシダーゼ	5 U/ml
コレステロールエステラーゼ	1 U/ml
コレステロールオキシダーゼ	5 U/ml

次いで、37℃で5分間インキュベーションし、直ちに同波長における吸光度を測定した(E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200 mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の値を比較す

ることにより算出した。その結果、HDLコレステロール濃度は $39.1 \text{ mg/dl}$ と算出され、沈澱法で得られた結果とほぼ一致した。

#### 実施例 6

(1) デキストランを修飾する試薬であるT40, TCT-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、(2) ポリウレタンを修飾する試薬であるポリウレタンP4000-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、および(3) 1, 3-プロパンサルトンでコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したものを用い、また、検体としてリントングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈澱法でHDLコレステロール濃度が $38.9 \text{ mg/dl}$ と測定された検体 $50 \mu\text{l}$ を用いて、実施例4と同様の操作を行った。

なお、化学修飾は、以下のようにして行った。

(1) および(2) については、 $20 \text{ mM}$ リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 8$ ) に酵素 ( $10 \text{ mg/ml}$ ) を溶解させて $5^\circ\text{C}$ に冷却後、これに20倍モルのT40, TCT-activatedおよびポリウレタンP4000-activatedをそれぞれ添加して溶解させ、 $5^\circ\text{C}$ で4時間反応させた。

(3) については、 $20 \text{ mM}$ リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 8$ ) に酵素 ( $10 \text{ mg/ml}$ ) を溶解させ、これに20倍モルの1, 3-プロパンサルトンのジメチルホルムアミド溶液 ( $10 \text{ mg/ml}$ ) を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で24時間反応させた。

(1)、(2) および(3) について得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

その結果、HDLコレステロール濃度はそれぞれ(1)  $39.7 \text{ mg/dl}$ 、(2)  $38.2 \text{ mg/dl}$ および(3)  $39.0 \text{ mg/dl}$ と算出され、沈澱法で得られた結果とほぼ一致した。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法が提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 高密度リポ蛋白 (HDL) 以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDL を含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

2. HDL 以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リントングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる群から選ばれるものである請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

3. コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00378

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12Q1/60, 1/44, 1/26, 1/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12Q1/60, 1/44, 1/26, 1/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Original by Izumi Kanai, Edited by Masamitsu Kanai, "A Summary of Clinical Test" (No. 29 revised edition) June 30, 1983 (30. 06. 83), Kanehara Shuppan (Tokyo) P.471-474	1 - 3
A	JP, A, 62-69999 (Boehringer Mannheim GmbH.), March 31, 1987 (31. 03. 87) & EP, A, 218127	1 - 3
A	JP, A, 63-126498 (Boehringer Mannheim GmbH.), May 30, 1988 (30. 05. 88) & EP, A, 265933	1 - 3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 10, 1995 (10. 04. 95)

Date of mailing of the international search report

April 25, 1995 (25. 04. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/60, 1/44, 1/26, 1/32		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/60, 1/44, 1/26, 1/32		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	金井泉原著, 金井正光編著「臨床検査法提要 (改訂第29版)」 30. 6月, 1983 (30. 06. 83), 金原出版 (東京) P. 471-474	1-3
A	JP, A, 62-69999 (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼル シャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 31. 3月, 1987 (31. 03. 87) & EP, A, 218127	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
10. 04. 95		25. 04. 95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-126498 (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼル シャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 30. 5月. 1988 (30. 05. 88) & EP, A, 265933	1-3